

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第34卷 第8期

Vol.34 No.8

2013

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版



目次

2006 ~ 2009 年我国超大城市霾天气特征及影响因子分析	戴永立, 陶俊, 林泽健, 谢绍东, 曹军骥, 张仁健 (2925)
南京北郊秋季 VOCs 及其光化学特征观测研究	李用宇, 朱彬, 安俊琳, 高晋微, 夏丽, 张祥志, 秦玮, 汤莉莉 (2933)
大气 PM _{2.5} 中水溶性离子在线观测技术的应用研究	程萌田, 潘月鹏, 王辉, 刘全, 王跃思 (2943)
一种纳米气溶胶发生系统的设计及性能测试	麦华俊, 蒋靖坤, 何正旭, 郝吉明 (2950)
焦炉顶和厂区环境中有机碳和元素碳的粒径分布	刘效峰, 彭林, 白慧玲, 牟玲, 宋耕芳 (2955)
昼夜增温对大豆田土壤 N ₂ O 排放的影响	胡正华, 周迎平, 崔海玲, 陈书涛, 肖启涛, 刘艳 (2961)
不同土地利用方式下冬季 N ₂ O 排放及其影响因素	伍延正, 张苗苗, 秦红灵, 侯海军, 陈春兰, 魏文学 (2968)
基于支持向量回归模型的水稻田甲烷排放通量预测研究	陈强, 蒋卫国, 陈曦, 袁丽华, 王文杰, 潘英姿, 王维, 刘孝富, 刘海江 (2975)
夏季黄海和渤海微表层和次表层海水中营养盐的分布特征	王文涛, 杨桂朋, 于娟, 吴冠伟 (2983)
氮磷浓度对东海原甲藻优势种群吸附 BDE28 和 BDE47 的影响	汪芳, 葛蔚, 柴超, 孟祥霞 (2992)
基于光学分类的太湖水体叶绿素 a 浓度高光谱遥感	孙德勇, 周晓宇, 李云梅, 陈晓玲, 黄昌春, 龚绍琦 (3002)
基于浮游细菌生物完整性指数的河流生态系统健康评价——以滇池流域为例	黄艺, 舒中亚 (3010)
珠江三角洲城市非点源 COD 影响因素分析及其负荷估算	廖义善, 卓慕宁, 李定强, 郭太龙 (3019)
珠江流域河流碳输出通量及变化特征	张连凯, 覃小群, 杨慧, 黄奇波, 刘朋雨 (3025)
三峡库区兰陵溪小流域养分流失特征	曾立雄, 肖文发, 黄志霖, 王佐庆 (3035)
三峡库区消落带典型草本植物淹水浸泡后可溶性有机碳的释放特征	谭秋霞, 朱波, 花可可 (3043)
混合层深度对藻类生长的影响研究	陈洋, 杨正健, 黄钰铃, 张平, 刘德富 (3049)
伊乐藻-氮循环菌联用对太湖梅梁湾水体脱氮的研究	赵琳, 李正魁, 周涛, 吴宁梅, 叶忠香, 刘丹丹 (3057)
组合型生态浮床对上覆水和沉积物之间氮磷的影响	郑立国, 杨仁斌, 王海萍, 宋建军 (3064)
生物炭覆盖对底泥污染物释放的影响	李扬, 李锋民, 张修稳, 吴召富, 于辉 (3071)
东莞石马河流域重金属污染及生态毒性的时空差异	高磊, 陈建耀, 柯志庭, 王江, 杨雪韵, 清水裕太 (3079)
连环湖牙门气泡沉积物重金属演化 and 污染研究	肖海丰, 臧淑英, 关莹, 刘少军, 徐海凤, 孙清展, 王京京, 李苗 (3088)
人工湿地净化工业区含非污染降雨径流的效果研究	敬丹丹, 王金泉, 马邕文, 李东亚, 王艳, 黄明智 (3095)
四环素抗性基因在人工湿地中的去除及累积	郑加玉, 刘琳, 高大文, 刘超翔 (3102)
不确定节点水量下水质监测点优化选址方法	刘书明, 吴雪, 欧阳乐岩 (3108)
饮用水中含氮消毒副产物三氯硝基甲烷的形成过程和影响因素	丁春生, 邹邦文, 缪佳, 傅洋平, 沈嘉辰 (3113)
漆酶催化氧化水中雌激素的研究	夏青, 谢卫平, 刘国强, 廖云燕, 王斌楠, 孔德洋, 陆隼鹤 (3119)
碳纳米管电极电还原降解水中头孢他啶	朱宏, 胡翔, 李俊峰 (3125)
UV-vis 光照下喹类抗菌药氟康唑的光化学反应类型	葛林科, 李凯, 杨凯, 邢广水, 于春艳, 张蓬, 姚子伟 (3132)
氙灯/TiO ₂ 体系下敌草隆光催化降解动力学研究	阳海, 曾健, 黎源, 阳立平, 易兵 (3137)
羟基磷灰石对水中刚果红的吸附作用研究	詹艳慧, 林建伟 (3143)
乙醇处理对树脂基纳米水合氧化铁结构及其除砷性能的影响	万琪, 李旭春, 潘丙才 (3151)
污水中溶解性有机氮类化合物的氯化反应特性及其消毒副产物生成潜能	刘冰, 于鑫, 余国忠, 古励, 赵承美, 翟慧敏, 李清飞 (3156)
短程深度脱氮中试工艺的低温启动和维持	顾升波, 王淑莹, 彭永臻 (3164)
生物活性炭厌氧氨氧化反应器启动过程研究	赖玮毅, 周伟丽, 何圣兵 (3171)
东北三省畜禽养殖粪固氮激素排放及其潜在污染风险	刘妹芳, 李艳霞, 张雪莲, 冯成洪, 鲁肖飞, 杨明, 李帷, 朱铁群, 黄泽春 (3180)
淮河流域土壤中全氟化合物的空间分布及组成特征	孟晶, 王铁宇, 王佩, 吕永龙 (3188)
华北平原典型区土壤氟的形态及其分布特征	易春瑶, 汪丙国, 靳孟贵 (3195)
长期施磷的产量效应及其环境风险评价	颜晓, 王德建, 张刚, 冉景, 郑继成 (3205)
污灌土壤中有机氯农药对沿渠土壤的影响	徐亮, 张彩香, 刘敏, 廖小平, 姚林林, 李佳乐, 向青清 (3211)
表面活性剂及其组合洗脱污染土壤中的硫丹	熊佰炼, 郑国灿, 张进忠, 邢贻, 徐卫红 (3216)
黄土丘陵区不同坡向对土壤微生物生物量和可溶性有机碳的影响	赵彤, 蒋跃利, 闫浩, 黄懿梅, 安韶山 (3223)
氮素添加对樟树林红壤微生物的影响	郁培义, 朱凡, 宿少锋, 王志勇, 闫文德 (3231)
医疗废物焚烧炉周边环境介质中二噁英的浓度、同系物分布与来源分析	黄文, 张素坤, 杜国勇, 张漫雯, 冯桂贤, 任明忠 (3238)
固相微萃取和固相萃取评价多环芳烃降解过程中的生物有效性变化	郭美霞, 巩宗强, 李晓军, 刘丹, 王悦 (3244)
改良型固定化 <i>Pseudomonas oleovorans</i> DT4 降解四氢呋喃的研究	邵钱, 叶杰旭, 欧阳杜娟, 陈建孟, 陈东之 (3251)
PCR-DGGE 技术解析固体碳源表面生物膜的微生物群落结构	徐影, 仇天雷, 韩梅琳, 李军, 王旭明 (3257)
温度对嗜酸性硫杆菌活性和生物成因次生铁矿物形成的影响	宋永伟, 赵博文, 霍敏波, 崔春红, 周立祥 (3264)
小白菜对外源硝酸盐和亚硝酸盐动态吸收的差异及其机制研究	郭璐, 满楠, 梁东丽, 谢钧宇, 刘娟娟 (3272)
预处理对打捆麦秸贮存和厌氧生物产沼气的的影响	马慧娟, 陈广银, 杜静, 常志州, 叶小梅 (3280)
硝酸盐对淡水水生生物毒性及水质基准推导	张铃松, 王业耀, 孟凡生, 周岳溪, 于海斌 (3286)
生物毒性测试微孔板 MTOXPlate 的分析性能研究	林奕云, 张国霞, 贺丽苹, 孙国萍, 许玫英 (3294)
两种实验设计研究 DES 和 EV 对 MCF-7 细胞增殖的联合作用	刘倩, 雷炳莉, 安静, 尚羽, 钟玉芳, 康佳, 文育 (3303)
中国近海海洋环境多氯联苯 (PCBs) 污染现状及其影响因素	刘敏霞, 杨玉玉, 李庆孝, 王俊 (3309)
城市污水处理厂出水中的药品和个人护理品	郑少奎, 李晓峰 (3316)
生物炭封存技术研究进展	姜志翔, 郑浩, 李锋民, 王震宇 (3327)
饮用水水源地严格管理水质的对策分析——对实行严格水资源管理问题上的看法和建议	傅国伟 (3334)
《环境科学》征稿简则 (2967) 《环境科学》征订启事 (3034) 信息 (3063, 3136, 3194, 3302)	

PCR-DGGE 技术解析固体碳源表面生物膜的微生物群落结构

徐影^{1,2}, 仇天雷¹, 韩梅琳¹, 李军², 王旭明^{1*}

(1. 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; 2. 沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110866)

摘要:以聚乳酸/聚羟基丁酸戊酸共聚酯 (PLA/PHBV) 作为填充床反应器的碳源和生物膜载体, 对受硝酸盐污染的水进行生物反硝化脱氮。采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术分析了 PLA/PHBV 表面生物膜中微生物群落的结构和动态变化。结果表明, 反应器运行初期, 生物膜中微生物多样性下降。当反应器稳定运行时, DGGE 图谱特征条带的香农-威尔逊指数和辛普森指数均变化不大, 微生物群落结构保持相对稳定。DGGE 图谱特征条带的 16S rDNA 序列分析及扫描电镜分析的结果表明, 生物膜中的主要微生物均为革兰氏阴性杆菌, 包括 *Diaphorobacter*、*Acidovorax*、*Rubrivivax*、*Azospira*、*Thermomonas* 和 *Devosia*, 它们分别属于变形菌门 (Proteobacteria) 的 α -、 β -和 γ -变形菌纲, 其中 *Diaphorobacter* 为反应器稳定运行期生物膜中丰度最高的菌群。

关键词: 固体碳源; 硝酸盐; 微生物群落; PCR-DGGE; PLA/PHBV

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)08-3257-07

Analysis on Microbial Community in Biofilm Coating onto Solid Carbon Source Using the PCR-DGGE Technique

XU Ying^{1,2}, QIU Tian-lei¹, HAN Mei-lin¹, LI Jun², WANG Xu-ming¹

(1. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing 100097, China; 2. College of Land Resources and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Polylactic acid/Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) (PLA/PHBV) granules were used as both carbon source and biofilm carrier for nitrate removal from the contaminated water. The polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was used to investigate the dynamic change of microbial community in the biofilm coating onto PLA/PHBV granules. The results showed that a decrease in microbial diversity was observed at the initial stage of reactor operation. Shannon-Wiener and Simpson diversity indexes of microbial community in the biofilm slightly changed during the stable period of the reactor running. The major microorganisms in the biofilm were Gram-negative rod bacteria including the genera of *Diaphorobacter*, *Acidovorax*, *Rubrivivax*, *Azospira*, *Thermomonas* and *Devosia*, and all of them belonged to α -, β - and γ -Proteobacteria, according to the SEM photo of biofilm and 16S rDNA sequences of the DGGE profile. Moreover, the abundance of *Diaphorobacter*-like genera was the highest in the solid-phase-denitrification biofilm.

Key words: solid carbon source; nitrate; microbial community; PCR-DGGE; PLA/PHBV

固相反硝化是利用非水溶性可生物降解聚合物同时作为微生物的碳源和生物膜载体, 对含硝酸盐的污染水进行反硝化脱氮^[1,2]。固相反硝化能克服传统反硝化工艺中可溶性碳源 (如甲醇、乙醇、乙酸等) 容易投加过量, 系统的稳定运行和维护比较困难等弊端, 目前已成功应用于饮用水和低 C/N 比污水中硝酸盐的去除^[1-5]。

在固相反硝化工艺的运行中, 固体碳源表面会形成生物膜。依靠生物膜中微生物的分解作用使固体碳源释放出可溶性有机碳, 生物膜中的反硝化微生物利用固体碳源分解产生的可溶性有机碳作为电子供体, 使污染水中的硝酸盐通过反硝化作用形成 N_2 气, 从而实现硝酸盐的去除。目前, 关于固相反

硝化的研究大多只停留于探讨不同固体碳源用于反硝化脱氮的可行性, 对于反应体系中的微生物群落结构还缺少系统研究。Boley 等^[6]以聚己内酯 (PCL) 为固体碳源去除饮用水中的硝酸盐, 从生物膜中分离了 246 株细菌, 其中 78% 为 *Acidovorax facilis*。Hiraishi 等^[1]的研究表明, 能以聚羟基丁酸戊酸共聚酯 (PHBV) 为碳源的反硝化菌主要为 β -Proteobacteria 类群中的 Comamonadaceae。以上研究

收稿日期: 2012-11-09; 修订日期: 2012-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21077014); 北京市科技计划项目 (Z121100001512008); 现代农业产业技术体系北京市创新团队建设专项; 北京市农林科学院科技能力创新专项

作者简介: 徐影 (1986 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制, E-mail: 1365437-7908@163.com

* 通讯联系人, E-mail: wangxm413@163.com

都是通过纯培养的方法得到有关固相反硝化的微生物学信息,但环境样品中,仅有 1% 甚至更少的微生物可通过传统的纯培养方法进行分离^[7],因此不能真实反映反硝化过程中微生物群落的种群组成和动态变化规律. 由于分子生态学技术可以通过直接从环境样品中提取微生物 DNA,而不需要对微生物进行分离培养,因而能够动态研究微生物群落的多样性,可以真实地反映微生物的在存状态. 近年来,越来越多的研究者开始应用分子生态学技术更好地揭示了微生物与环境之间的生态学意义^[8-10],为环境污染的生物修复提供了理论依据.

本研究利用分子生态学方法中的聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术^[11]对固相反硝化生物膜中的微生物群落结构进行解析,以揭示固相反硝化脱氮过程中微生物群落的组成及其动态变化,以期为工艺优化与反应机制的研究提供分子生态学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

以聚乳酸/聚羟基丁酸戊酸共聚酯 (PLA/PHBV) 颗粒(购于深圳光华伟业实业有限公司)为反硝化的碳源. PLA/PHBV 为白色椭圆形颗粒物,比表面积为 $0.015\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$,密度为 $1.23\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

1.2 实验装置

图 1 是实验装置示意. 反应器为内径 6 cm、高 50 cm 有机玻璃柱,填充 350 g PLA/PHBV 颗粒(干重),反应器有效容积(反应器中液相所占的体积)为 1.248 L. 反应器进水由自来水加硝酸钠配制,以模拟受硝酸盐污染的水. 反应器采用上流式进水,进水流速由蠕动泵调节. 向进水中通入高纯氮气,

使 DO 浓度低于 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,以保证反硝化作用的正常进行.

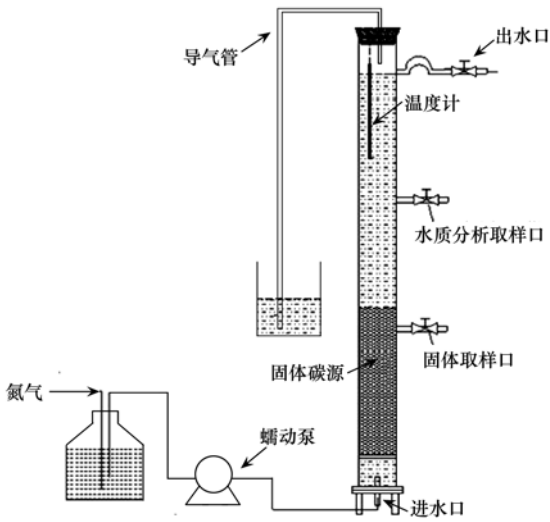


图 1 实验装置示意

Fig. 1 Schematic representation of the experimental set-up

1.3 反应器运行与取样方法

以实验室运行的 SBR 反应器中的活性污泥作为接种物,按文献[12]的方法启动和运行反硝化反应器,水力停留时间(HRT)为 1.65 h. 在反应器运行的不同时期采集生物膜样品. 超声波剥离生物膜,弃掉固体碳源,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃掉上清液,沉淀部分即为含有 PLA/PHBV 表面生物膜的样品, -20°C 保存. 具体采样时间及装置的运行状况见表 1.

在稳定运行的反应器中取具有完整生物膜的碳源颗粒,用 2.5% 戊二醛固定 2 h,然后采用丙酮/醋酸异戊酯(1:1)脱水,冷冻干燥后用扫描电镜(S-3400N, Hitachi)观察生物膜中的微生物形态.

表 1 采样时间及反应器的运行状态

Table 1 Sampling time and operation state of the reactor

取样时间 /d	样品编号 ¹⁾	进水硝态氮浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	出水硝态氮浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	反硝化速率 / $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$	出水亚硝态氮浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	出水 COD 浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
—	1	—	—	—	—	—
24	2	85	25.98	35.77	0.12	16.45
48	3	85	5.62	48.11	0.09	20.18
62	4	85	5.77	48.02	0.08	21.21

1) 1 为接种微生物; 2 为运行初期生物膜样品; 3、4 分别为稳定期 I 和稳定期 II 的生物膜样品

1.4 总 DNA 的提取

生物膜的基因组 DNA 采用 The Power Soil DNA Isolation Kit(MO-BIO Laboratorie)提取,获得的基因组 DNA 用 1% 凝胶电泳检测. 利用 GelRed (Biotium 公司)染料染色, Alphamager HP 凝胶成像系统

(Protein Simple, USA)进行拍照检测.

1.5 PCR 扩增

通过细菌通用引物含有 GC 夹的 BAC341F(5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG3')和

534R(5'ATT ACC GCG GCT GCT GG3')(上海生工合成)扩增细菌 16S rDNA V3 区片段^[13,14]. 扩增体系为 50 μL : 10 $\times$ Ex Taq Buffer 5 μL , dNTP (2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 4 μL , BAC341FGC (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , 543R (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , Ex Taq DNA 聚合酶 (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.6 μL , ddH₂O 37.4 μL .

PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 1 min (每循环减少 0.5℃), 72℃ 延伸 1 min, 循环 20 次; 94℃ 变性 1 min, 61℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 5 次; 72℃ 延伸 10 min. PCR 扩增产物检测同基因组 DNA 检测.

1.6 变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 分析

采用 Bio-Rad 公司 D-code™ 的通用基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离. 使用梯度混合装置, 制备 8% 聚丙烯酰胺胶, 变性剂浓度从 35% ~ 70% (100% 的变性剂为 7 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物), 其中变性剂和丙烯酰胺的浓度从胶的上方向下方依次递增. 待变性梯度胶完全凝固后, 将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 取 PCR 样品 5 μL 和 10 倍加样缓冲液混合后加入上样孔.

电泳条件: 1 $\times$ TAE (20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 冰醋酸, 0.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 7.5) 缓冲液, 电压 130 V 条件下 60℃ 电泳 6 h. 电泳结束后, 使用 SUPER Green I 染液凝胶染色 30 min, 在 Alphamager HP 凝胶成像系统 (Protein Simple, USA) 进行拍照, 所得图像用 QUANTITY ONE (Bio-Rad) 软件分析 DGGE 的指纹图谱, 通过分析样品电泳条带的数目和亮度, 来评估微生物多样性和种群相对数量.

将条带相对浓度数据数字化后用 MVSP 3.1 软件分析条带的香农-威尔 (Shannon-Wiener) 指数 HP 和辛普森 (Simpson) 指数 D , 具体计算公式如下:

$$HP = - \sum (P_i \ln P_i)$$

$$D = N(N-1) / \sum (n_i-1)n_i$$

式中, P_i 是第 i 种个体数 n 占总个体数 N 的比例; n_i 是第 i 种的个体数; N 为所有种的个体数.

1.7 切胶回收 DGGE 目的条带

对优势条带进行切胶, 回收的目的条带捣碎悬浮于 50 μL ddH₂O 中, 放置过夜, 以上清作为 PCR 模板, 利用引物 BAC341F (5'CC TAC GGG AGG CAG CAG3') 和 534R (5'ATT ACC GCG GCT GCT

GG3') 进行扩增. PCR 体系同上, PCR 反应过程如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 循环 30 次; 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. PCR 产物利用 pGEM-T Easy System I kit (Promega) 连接, 热击转化, 蓝白筛选, 挑克隆后提取质粒, 送至中科希林公司测序.

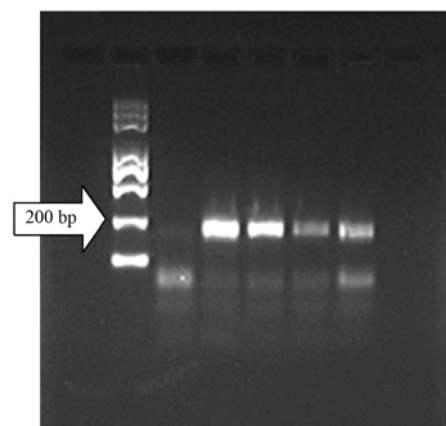
1.8 16S rDNA 序列分析

测序结果经 Nucleotide Blast 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 与已知片段进行比对, 下载相似性较高菌株的 16S rDNA 序列, 通过 Clustal X 程序进行聚类分析, 利用 MEGA4 程序中的邻位连接法 (Neighbor-Joining) 构建进化树^[15].

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 的 PCR 扩增

使用复杂的基因组 DNA 模板, 易出现非特异性扩增. 本研究采用 Touch down PCR, 以避免非特异性 PCR 产物的出现. 以等量 DNA 模板进行 PCR 扩增, 电泳检测得到的 16S rDNA 扩增产物大小约为 190 bp, 为目标片段长度, 无明显非特异性扩增, 结果见图 2. 各样品的扩增产物条带单一, 浓度可满足 DGGE 分析要求.



由左至右依次是 Marker、空白、样品 1~4

图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Map of PCR products after agarose gel electrophoresis

2.2 DGGE 图谱分析

样品的 PCR 产物经 DGGE 分离出数目、强度和迁移位置都不同的条带 (图 3), 这些不同位置的条带对应不同的细菌种类^[16], 电泳条带越多, 说明样品中细菌种类多样性越高^[17]; 条带浓度越高, 表示该条带代表的细菌数量较高, 属于当前条件下的优势种群.

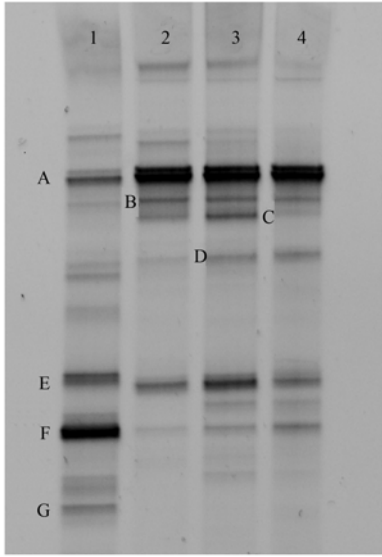


图3 固相反硝化工艺不同运行阶段的生物膜 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE-gel showing 16S rDNA community fingerprint of the biofilm coating onto PLA/PHBV granules at different operation time

从图3可以看出,生物膜样品的条带数(泳道2、3、4)明显少于接种污泥的条带数(泳道1),这是由于接种污泥来自实验室运行的SBR反应器(处理高氨氮废水),细菌种类较丰富,相应的代表多样性指数的香农威尔指数也高(表2).反应器运行初期,细菌种群随着反应器运行逐渐适应新的碳源条件,部分种类得以富集(泳道2),条带变亮(A条带),表明其成为此时期的优势菌;部分条带变淡(F条带),表明该条带所指示的菌群丰度下降;有的条带甚至消失(G条带),表明该菌种不能在以PLA/PHBV为碳源的固相反硝化条件下生长.泳道2的条带数明显减少,很多细菌被单一碳氮源的环境所淘汰,造成生物多样性迅速下降,香农威尔指数从2.182迅速降低到1.612,相反表现物种丰度的辛普森指数从1.145增加至1.366;运行初期到稳定期I(泳道3),A、B、E这3个方向的条带信号均变强,表明这3种条带代表的细菌逐渐适应反应器中的环境,能够利用PLA/PHBV固体碳源生存或具有脱氮作用;随着反应器运行时间的延长,能够利用固体碳源的微生物逐渐增多或活性逐渐增强,使微生物的多样性有部分的增加,香农威尔指数达

表2 菌群多样性指数变化表

Table 2 Diversity index changes in flora

多样性指数	接种污泥 (1)	运行初期 (2)	稳定期 I (3)	稳定期 II (4)
香农威尔指数	2.182	1.612	2.006	1.981
辛普森指数	1.145	1.366	1.217	1.224

到2.006;稳定期I泳道上的条带数与稳定期II(泳道4)相比,香农威尔指数、辛普森指数差别都不大,两者条带的相似性也达到85%(图4),表明反应器稳定运行期间,微生物群落未发生明显改变,这是反应器维持稳定运行的直接原因.

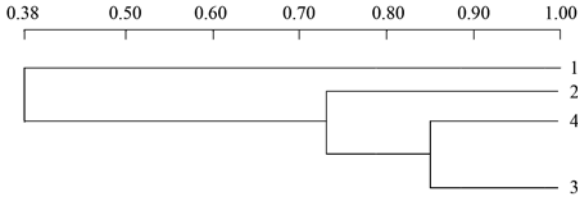


图4 不同时期生物膜微生物群落的聚类分析

Fig. 4 Tree representing the genetic similarity of the bacteria community in biofilms

2.3 特征条带的回收测序和系统发育分析

7条变化明显的优势条带经过切胶回收、PCR扩增、克隆转化,提取质粒后送至测序公司测序.测序得到的结果经Blast比较鉴定^[18],寻找与序列相似性最高的已知分类地位的菌株,结果见表3.与条带A、C、E、F、D、B最相近的菌株均属于变形菌门(Proteobacteria),只有与G最接近的菌株为不可培养的菌株,而G条带所指示的菌群只存在于接种污泥中,最终在反应器中消失(图3),因此不是固相反硝化条件下(以PLA/PHBV为碳源)的功能菌群.对上述条带序列利用Clustal X程序进行聚类分析,应用MEGA4程序中的邻接法按Kimura 2-parameter model算法构建进化树,结果如图5所示.

A代表的菌群存在于接种污泥中,在反应器的运行初期即成为生物膜的优势种群,并在运行的过程中一直占绝对优势(图3).与A最接近的菌株为*Diaphorobacter nitroreducens*. Khan等的研究表明^[19,20],该种细菌能以聚β-羟基丁酸(PHB)和PHBV为唯一碳源进行反硝化脱氮. B与菌株*Acidovorax* sp. R-25052的相似性为99%. *Acidovorax* sp. R-25052是Heylen等^[21]从活性污泥中分离到的具有反硝化作用的菌株,与*Diaphorobacter*都属于丛毛单胞菌科(Comamonadaceae).研究表明,当以PHB和PHBV为碳源时,*Diaphorobacter*和*Acidovorax*能分泌胞外PHB解聚酶,使PHB和PHBV降解,同时进行反硝化^[22].条带C是随着反应器的运行才出现的(图3),与C最接近的菌株为*R. benzoatilyticus* JA2,属于伯克氏菌目(Burkholderiales)中未分类科.菌株*Rubrivivax benzoatilyticus* JA2属于光合细菌中的紫色

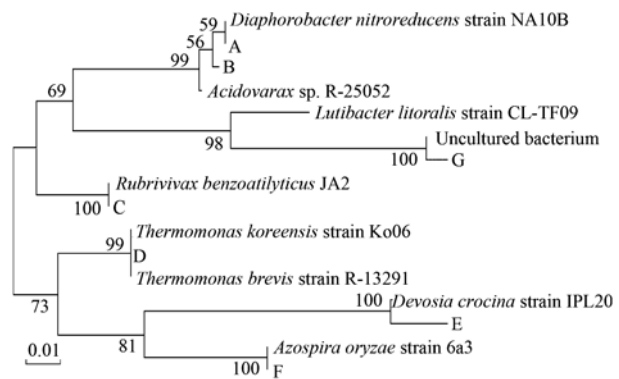
非硫细菌,能够以苯二甲酸酯类、苯丙氨酸类、苯、水杨酸、环己酮、环己醇等芳香族碳氢化合物为碳源,并能在细胞内积累大量的聚羟基脂肪酸酯(PHA),但不能利用硝酸盐和亚硝酸盐^[23].最近的研究表明,*Rubrivivax* 中的 *R. gelatinosus* 能将亚硝酸盐还原为 N₂,但不能还原硝酸盐^[24,25]. F 与 *Azospira oryzae* 的相似性最高. *Azospira oryzae* 除了能固氮之外,还具有反硝化功能^[26]. D 条带在运行初期丰度较低,在稳定期成为优势种群之一,它与 Mergaert 等^[27]分离的反硝化菌 *Thermomonas brevis* 相似性达 99%. E 与 *Devosia crocina* 的相似性最高(99%),*Devosia crocina* 的典型菌株不具有反硝化活性^[28],但有研究表明,*Devosia* 属中的某些种可以进行硝酸盐还原,如 *D. riboflavina* 和 *D. neptuniae*^[29].

综上所述,根据 DGGE 图谱(图 3)和系统发育分析(图 5),可以确定当反应器稳定运行时,固体碳源 PLA/PHBV 表面生物膜的主要微生物组成包括

Diaphorobacter、*Acidovorax*、*Rubrivivax*、*Azospira*、*Thermomonas*、*Devosia* 这 6 个属的菌株,它们都属于变形菌门(Proteobacteria),分属于 α -变形菌纲(条带 E)、 β -变形菌纲(条带 A、B、C、F)和 γ -变形菌纲(条带 D)的不同科.它们均为革兰氏阴性杆菌,扫描电镜观察的结果也证实了生物膜中的微生物主要为杆菌(图 6).以上菌属均可以进行反硝化,*Diaphorobacter*、*Acidovorax* 可以降解 PHBV,但目前还没有报道证实上述菌属可以降解 PLA^[30].目前已纯培养的能够利用 PHA 生长且能进行反硝化作用的菌株,全部属于变形菌门(Proteobacteria)^[19,20,31],这一结果与 PCR-DGGE 分析结果一致.但本研究中生物膜稳定期优势菌株中,只有 *Diaphorobacter* 与 *Acidovorax* 两属中已有纯培养菌株能够利用 PHA 进行反硝化,*Azospira*、*Thermomonas*、*Devosia* 这 3 个属还未有研究报道,所以该结果可以为新的固相反硝化菌株分离提供依据.

表 3 DGGE 条带测序 BLAST 比对结果
Table 3 BLAST results of DGGE band sequences

条带编号	登录号	最相近菌株	科	最相近菌株登录号	相似性/%
A	JX945598	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> NA10B	Comamonadaceae	NR_024782.1	100
C	JX945599	<i>Rubrivivax benzoatilyticus</i> JA2	unclassified Burkholderiales	NR_042385.1	100
E	JX945600	<i>Devosia crocina</i> IPL20	Hyphomicrobiaceae	NR_044213.1	99
F	JX945601	<i>Azospira oryzae</i> 6a3	Rhodocyclaceae	NR_024852.1	100
G	JX945602	Uncultured bacterium	—	JQ941864.1	99
D	JX945603	<i>Thermomonas brevis</i> R13291	Xanthomonadaceae	NR_043584.1	99
B	JX945604	<i>Acidovorax</i> sp. R25052	Comamonadaceae	AM084039.1	99



分支节点上的数字表示每 1 000 次 bootstrap 分析所支持的次数
图 5 基于 16S rDNA 序列的生物膜中主要菌群的系统发育树
Fig. 5 A phylogenetic tree showing microbial community in biofilm coating onto PLA/PHBV granules based on 16S rDNA sequences

3 结论

(1)与接种的活性污泥相比,在反应器的运行初期,固体碳源 PLA/PHBV 颗粒表面生物膜中的微生物多样性下降明显,但功能微生物的丰度增加.

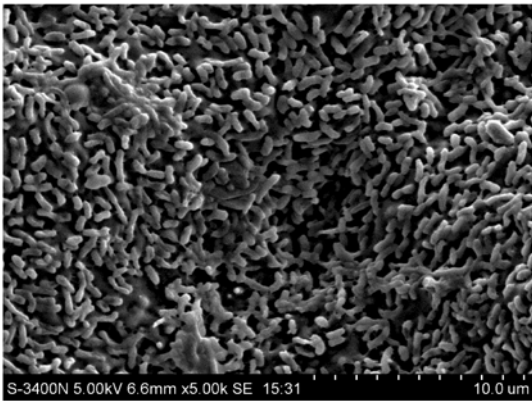


图 6 PLA/PHBV 颗粒表面生物膜的扫描电镜照片
Fig. 6 SEM photo of biofilm coating onto the surface of PLA/PHBV granule

(2)当反应器稳定运行时,DGGE 图谱中特征条带的香农威尔指数和辛普森指数均变化不大,微生物群落结构保持相对稳定,这是反应器能够稳定运行的直接原因.

(3)对反应器稳定运行期的生物膜特征条带进

行测序,通过与已知序列的比对,证实 *Diaphorobacter* 为生物膜中最优势菌群.此外,生物膜还包括 *Acidovorax*、*Rubrivivax*、*Azospira*、*Thermomonas*、*Devosia* 这 5 个属的菌株,以上菌株均属于变形菌门(Proteobacteria).

参考文献:

- [1] Hiraishi A, Khan S T. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, **61**: 103-109.
- [2] Boley A, Muller W R, Haider G. Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems[J]. Aquaculture Engineering, 2000, **22**(1-2): 75-85.
- [3] Wang X M, Wang J L. Denitrification of nitrate-contaminated groundwater using biodegradable snack ware as carbon source under low-temperature condition[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2012, **9**(1): 113-118.
- [4] Shen Z Q, Wang J L. Biological denitrification using cross-linked starch/PCL blends as solid carbon source and biofilm carrier[J]. Bioresource Technology, 2011, **102**(19): 8835-8838.
- [5] Rodrigues A L, Mosquera-Corral A, Machado A V, et al. Use of biopolymers as solid substrates for denitrification[J]. Water Science and Technology, 2012, **65**(1): 105-111.
- [6] Boley A, Mergaert J, Muller C, et al. Denitrification and pesticide elimination in drinking water treatment with the biodegradable polymer poly(ϵ -caprolactone) (PCL)[J]. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 2003, **31**(3): 195-203.
- [7] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, **59**(1): 143-169.
- [8] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, **345**(6270): 63-65.
- [9] Hesselmann R P X, Werlen C, Hahn D, et al. Enrichment phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, **22**(3): 454-465.
- [10] 吕昌勇, 陈朝银, 葛锋, 等. 微生物分子生态学研究方法的新进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, **32**(8): 111-118.
- [11] Li Q F, Zhang Y, Juck D, et al. Phylogenetic analysis of bacterial communities in the shrimp and sea cucumber aquaculture environment in northern China by culturing and PCR-DGGE[J]. Aquaculture International, 2010, **18**(6): 977-990.
- [12] 李军, 徐影, 王秀玲, 等. 固体碳源填充床反应器反硝化性能的研究[J]. 农业环境科学学报. 2012, **31**(6): 1230-1235.
- [13] Kjellerup B V, Veeh R H, Sumithraratne P, et al. Monitoring of microbial souring in chemically treated, produced-water biofilm systems using molecular techniques[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, **32**(4): 163-170.
- [14] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturant gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(2): 340-346.
- [15] Khan S T, Hiraishi A. Isolation and characterization of a new poly (3-hydroxybutyrate)-degrading, denitrifying bacterium from activated sludge[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, **205**(2): 253-257.
- [16] Konstantinov S R, Zhu W Y, Williams B A, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, **43**(2): 225-235.
- [17] Mohseni-Bandpi A, Elliot D J. Groundwater denitrification with alternative carbon sources[J]. Water Science and Technology, 1998, **38**(6): 237-243.
- [18] Altschu S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, **215**(3): 403-410.
- [19] Khan S T, Hiraishi A. *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2002, **48**(6): 299-308.
- [20] Khan S T, Horiba Y, Yamamoto M, et al. Members of the family Comamonadaceae as primary poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(7): 3206-3214.
- [21] Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, et al. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(4): 2637-2643.
- [22] Zhang T, Chaudhry M T, Liu Z P. Genetic and biochemical characterization of poly 3-hydroxybutyrate depolymerase from *Diaphorobacter* sp. PCA039[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, **26**(10): 1803-1811.
- [23] Ramana C V, Sasikala C, Arunasri K, et al. *Rubrivivax benzoatilyticus* sp. nov., an aromatic, hydrocarbon-degrading purple betaproteobacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, **56**(Pt9): 2157-2164.
- [24] Nagashima S, Kamimura A, Shimizu T, et al. Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144[J]. Journal of Bacteriology, 2012, **194**(13): 3541-3542.
- [25] Nagashima S, Shimada K, Verméglio A, et al. The cytochrome c_8 involved in the nitrite reduction pathway acts also as electron donor to the photosynthetic reaction center in *Rubrivivax gelatinosus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, **1807**(2): 189-196.
- [26] Bae H-S, Rash B A, Rainey F A. Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from

- groundwater [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, **57**(Pt7): 1521-1526.
- [27] Mergaert J, Cnockaert M C, Swings J. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly (epsilon-caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, **53** (Pt6): 1961-1966.
- [28] Verma M, Kumar M, Dadhwal M, *et al.* *Devosia albogilva* sp. nov. and *Devosia crocina* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, **59**(Pt4): 795-799.
- [29] Yoon J H, Kang S J, Park S, *et al.* *Devosia insulae* sp. nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Devosia* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, **57**(Pt6): 1310-1314.
- [30] 李凡, 王莎, 刘巍峰, 等. 聚乳酸(PLA)生物降解的研究进展[J]. 微生物学报, 2008, **48**(2): 262-268.
- [31] Mergaert J, Boley A, Cnockaert M C, *et al.* Identity and potential functions of heterotrophic bacterial isolates from a continuous-upflow fixed-bed reactor for denitrification of drinking water with bacterial polyester as source of carbon and electron donor[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2001, **24**(2): 303-310.

CONTENTS

Characteristics of Haze and Its Impact Factors in Four Megacities in China During 2006-2009	DAI Yong-li, TAO Jun, LIN Ze-jian, <i>et al.</i> (2925)
Characteristics of VOCs and Their Photochemical Reactivity in Autumn in Nanjing Northern Suburb	LI Yong-yu, ZHU Bin, AN Jun-lin, <i>et al.</i> (2933)
On-Line Measurement of Water-Soluble Composition of Particulate Matter in Beijing	CHENG Meng-tian, PAN Yue-peng, WANG Hui, <i>et al.</i> (2943)
Design and Evaluation of an Aerosol Nanoparticle Generation System	MAI Hua-jun, JIANG Jing-kun, HE Zheng-xu, <i>et al.</i> (2950)
Aerosol Size Distribution of Organic Carbon and Elemental Carbon on the Top of Coke Oven and in the Plant Area	LIU Xiao-feng, PENG Lin, BAI Hui-ling, <i>et al.</i> (2955)
Effects of Diurnal Warming on Soil N ₂ O Emission in Soybean Field	HU Zheng-hua, ZHOU Ying-ping, CUI Hai-ling, <i>et al.</i> (2961)
N ₂ O Flux in Winter and Its Affecting Factors Under Different Land Use Patterns	WU Yan-zheng, ZHANG Miao-miao, QIN Hong-ling, <i>et al.</i> (2968)
Prediction of Methane Emission of Paddy Field Based on the Support Vector Regression Model	CHEN Qiang, JIANG Wei-guo, CHEN Xi, <i>et al.</i> (2975)
Distributional Characteristics of Nutrients in the Sea-surface Microlayer and Subsurface Water of the Bohai and Yellow Sea in Summer	WANG Wen-tao, YANG Gui-peng, YU Juan, <i>et al.</i> (2983)
Effect of Nitrogen and Phosphorus Concentrations on the Adsorption of BDE28 and BDE47 by <i>Prorocentrum donghaiense</i> Dominant Population	WANG Fang, GE Wei, CHAI Chao, <i>et al.</i> (2992)
Hyperspectral Remote Sensing of Chlorophyll a Concentrations in the Lake Taihu, Based on Water Optical Classification	SUN De-yong, ZHOU Xiao-yu, LI Yun-mei, <i>et al.</i> (3002)
Bacterioplankton Index of Biotic Integrity (BP-IBI): An Approach for Assessing River Ecosystem Health in Dianchi Watershed	HUANG Yi, SHU Zhong-ya (3010)
Estimation of Urban Non-Point Source Pollution Loading and Its Factor Analysis in the Pearl River Delta	LIAO Yi-shan, ZHUO Mu-ning, LI Ding-qiang, <i>et al.</i> (3019)
Transported Fluxes of the Riverine Carbon and Seasonal Variation in Pearl River Basin	ZHANG Lian-kai, QIN Xiao-qun, YANG Hui, <i>et al.</i> (3025)
Characteristics of Nutrient Loss of Lanlingxi Watershed in the Three Gorges Reservoir Area	ZENG Li-xiong, XIAO Wen-fa, HUANG Zhi-lin, <i>et al.</i> (3035)
Characteristics of Dissolved Organic Carbon Release Under Inundation from Typical Grass Plants in the Water-Level Fluctuation Zone of the Three Gorges Reservoir Area	TAN Qiu-xia, ZHU Bo, HUA Ke-ke (3043)
Research on the Influence of Mixing Layer Depth on Algal Growth	CHEN Yang, YANG Zheng-jian, HUANG Yu-ling, <i>et al.</i> (3049)
Denitrification Study of <i>Elodea nuttallii</i> -Nitrogen Cycling Bacteria Restoration in Meiliang Bay, Taihu Lake	ZHAO Lin, LI Zheng-kui, ZHOU Tao, <i>et al.</i> (3057)
Influence of Combined Ecological Floating Bed on Nitrogen and Phosphorus Between Overlying Water and Sediment	ZHENG Li-guo, YANG Ren-bin, WANG Hai-ping, <i>et al.</i> (3064)
Effects of Biochar Covering on the Release of Pollutants from Sediment	LI Yang, LI Feng-min, ZHANG Xiu-wen, <i>et al.</i> (3071)
Temporal-spatial Difference of Ecotoxicity and Heavy Metals Pollution in Shima Catchment, Dongguan	GAO Lei, CHEN Jian-yao, KE Zhi-ting, <i>et al.</i> (3079)
Evolution and Pollution of Heavy Metals in Core Sediments from Yamenqi Lake in Lianhuan Lake, China	XIAO Hai-feng, ZANG Shu-ying, GUAN Ying, <i>et al.</i> (3088)
Effect of Constructed Wetland on the Purification of Industrial Zone Rainfall Runoff Contaminated with Phenanthrene	JING Dan-dan, WAN Jin-quan, MA Yong-wen, <i>et al.</i> (3095)
Removal and Accumulation of the Tetracycline Resistance Gene in Vertical Flow Constructed Wetland	ZHENG Jia-yu, LIU Lin, GAO Da-wen, <i>et al.</i> (3102)
Method for Optimal Sensor Placement in Water Distribution Systems with Nodal Demand Uncertainties	LIU Shu-ming, WU Xue, OUYANG Le-yan (3108)
Formation Process of Nitrogenous Disinfection Byproduct Trichloronitromethane in Drinking Water and Its Influencing Factors	DING Chun-sheng, ZOU Bang-wen, MIAO Jia, <i>et al.</i> (3113)
Removal of Estrogens in Laccase Catalyzed Oxidative Processes	XIA Qing, XIE Wei-ping, LIU Guo-qiang, <i>et al.</i> (3119)
Study on Electrochemical Degradation of Cefazidime by Carbon Nanotubes Electrode	ZHU Hong, HU Xiang, LI Jun-feng (3125)
Photochemical Reaction Types of the Azole Fungicide Fluconazole Under UV-vis Irradiation	GE Lin-ke, LI Kai, YANG Kai, <i>et al.</i> (3132)
Photocatalytic Degradation Kinetics of Diuron by TiO ₂ and Simulated Sunlight	YANG Hai, ZENG Jian, LI Yuan, <i>et al.</i> (3137)
Adsorption of Congo Red from Aqueous Solution on Hydroxyapatite	ZHAN Yan-hui, LIN Jian-wei (3143)
Ethanol-Induced Influence on the Structure and Arsenate Adsorption of Resin-based Nano-hydrated Ferric Oxide	WAN Qi, LI Xu-chun, PAN Bing-cai (3151)
Chlorination Characteristic and Disinfection By-product Formation Potential of Dissolved Organic Nitrogen Compounds in Municipal Wastewater	LIU Bing, YU Xin, YU Guo-zhong, <i>et al.</i> (3156)
Start-up and Maintenance Method for Short-Cut Advanced Nitrogen Removal Process in a Pilot-Scale Reactor at Low Temperature	GU Sheng-bo, WANG Shu-ying, PENG Yong-zhen (3164)
Study on the Start-Up of Anaerobic Ammonium Oxidation Process in Biological Activated Carbon Reactor	LAI Wei-yi, ZHOU Wei-li, HE Sheng-bing (3171)
Excretion of Manure-Borne Steroid Hormones and Their Potential Risk in the Three Northeast Provinces of China	LIU Shu-fang, LI Yan-xia, ZHANG Xue-lian, <i>et al.</i> (3180)
Spatial Distribution and Composition of Perfluorinated Compounds in Soils Around the Huaihe River	MENG Jing, WANG Tie-yu, WANG Pei, <i>et al.</i> (3188)
Fluorine Speciation and Its Distribution Characteristics in Selected Agricultural Soils of North China Plain	YI Chun-yao, WANG Bing-guo, JIN Meng-gui (3195)
Effects of Long-Term Manure and Crop Residues Incorporation on Yield and Phosphorus Saturation in a Paddy Soil	YAN Xiao, WANG De-jian, ZHANG Gang, <i>et al.</i> (3205)
Influence of Organochlorine Pesticides in Wastewater on the Soil Along the Channel	XU Liang, ZHANG Cai-xiang, LIU Min, <i>et al.</i> (3211)
Elution of Endosulfan from Contaminated Soil by Surfactants and Their Combination	XIONG Bai-lian, ZHENG Guo-can, ZHANG Jin-zhong, <i>et al.</i> (3216)
Effects of Different Aspects on Soil Microbial Biomass and Dissolved Organic Carbon of the Loess Hilly Area	ZHAO Tong, JIANG Yue-li, YAN Hao, <i>et al.</i> (3223)
Effects of Nitrogen Addition on Red Soil Microbes in the <i>Cinnamomum camphora</i> Plantation	YU Pei-yi, ZHU Fan, SU Shao-feng, <i>et al.</i> (3231)
Concentration, Profile Distribution and Source Identification of PCDD/Fs in Environmental Medium Around a HSWI	HUANG Wen, ZHANG Su-kun, DU Guo-yong, <i>et al.</i> (3238)
Assessment of Bioaccessibility of PAHs in Microbial Degradation Process Using Solid Phase Micro Extraction and Solid Phase Extraction	GUO Mei-xia, GONG Zong-qiang, LI Xiao-jun, <i>et al.</i> (3244)
Biodegradation of Tetrahydrofuran by Combined Immobilized of <i>Pseudomonas oleovorans</i> DT4	SHAO Qian, YE Jie-xu, OUYANG Du-juan, <i>et al.</i> (3251)
Analysis on Microbial Community in Biofilm Coating onto Solid Carbon Source Using the PCR-DGGE Technique	XU Ying, QIU Tian-lei, HAN Mei-lin, <i>et al.</i> (3257)
Effect of Temperature on Activity of <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> and Formation of Biogenic Secondary Iron Minerals	SONG Yong-wei, ZHAO Bo-wen, HUO Min-bo, <i>et al.</i> (3264)
Differences of Selenium Uptake Pattern of Pakchoi and the Possible Mechanism When Amended with Selenate and Selenite	GUO Lu, MAN Nan, LIANG Dong-li, <i>et al.</i> (3272)
Effect of Pretreatment on Storage and Biogas Production of Baling Wheat Straw	MA Hui-juan, CHEN Guang-yin, DU Jing, <i>et al.</i> (3280)
Toxicity of Nitrate-N to Freshwater Aquatic Life and Its Water Quality Criteria	ZHANG Ling-song, WANG Ye-yao, MENG Fan-sheng, <i>et al.</i> (3286)
Analysis Performance of Biological Toxicity Testing MTOXPlate Using Microplate	LIN Yi-yun, ZHANG Guo-xia, HE Li-ping, <i>et al.</i> (3294)
Study of Combined Effects of DES and EV on the Proliferation of MCF-7 Cells by Two Experimental Designs	LIU Qian, LEI Bing-li, AN Jing, <i>et al.</i> (3303)
Status and Influencing Factors of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Pollution in the Coastal Areas in China	LIU Min-xia, YANG Yu-yi, LI Qing-xiao, <i>et al.</i> (3309)
Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the Effluent of Sewage Treatment Plants	ZHENG Shao-kui, LI Xiao-feng (3316)
Research Progress on Biochar Carbon Sequestration Technology	JIANG Zhi-xiang, ZHENG Hao, LI Feng-min, <i>et al.</i> (3327)
Countermeasures for Strict Water Quality Management of Drinking Water Sources: Some Thoughts and Suggestions on Implementing Strict Water Resources Management	FU Guo-wei (3334)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2013年8月15日 34卷 第8期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 34 No. 8 Aug. 15, 2013

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行人